

Zellkinetik und Aberrationsverteilung
in Lymphozytenkulturen von Patienten mit
zytostatischer Intervalltherapie

von
Robert Lee Mueller
aus
Nürnberg

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. med. R. A. Pfeiffer

**Zellkinetik und Aberrationsverteilung
in Lymphozytenkulturen von Patienten mit
zytostatischer Intervalltherapie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Robert Lee Mueller

aus

Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof.Dr.med.V.Becker

Referent: Prof.Dr.rer.nat.E.Gebhart

Korreferent: Prof.Dr.med.R.A.Pfeiffer

Tag der mündlichen Prüfung: 7.Dezember 1981

felix qui potuit rerum cognoscere

**Meiner Pflegemutter
in Dankbarkeit gewidmet**

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	7
2. MATERIAL UND METHODE	
2.1. Patientengut	13
2.2. Kulturbedingungen	14
2.3. Färbung	14
2.4. Auswertung	15
3. ERGEBNISSE	
3.1. ABERRATIONSVERHALTEN VON T-LYMPHOZYTEN, DIE WÄHREND DER KULTURZEIT EINE, ZWEI ODER DREI DNA-REPLIKATIONEN VOLLZOGEN HABEN, IN ABHÄNGIGKEIT VON DER MUTAGENEN BELASTUNG.	
3.1.1. Grundlagen der Ergebnisdarstellung	19
3.1.2. Verteilung der Bruchraten in 1./2. und 3. Mitosen in Abhängigkeit von der mutagenen Belastung .	21
3.1.3. Aberrationsspektrum der untersuchten Metaphasen.	22
3.1.4. Verteilung des Anteils aberranter Zellen in 1./2. und 3. Mitosen im Verlauf der Therapie.	24
3.1.5. Unmittelbare Verlaufsbeobachtung der Therapie bei vier Patienten.	26
3.1.6. Auftreten von Zellen, die in 72 Stunden vier DNA-Replikationen vollzogen haben.	28

3.2. PROLIFERATIONSKINETIK VON T-LYMPHOZYTEN AUS DEM BLUT ZYTOSTATISCH BEHANDELTEN PATIENTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER MUTA- GENEN BELASTUNG.	
3.2.1. Verteilung 1./2. und 3. Mitosen unter der Therapie .	29
3.2.2. Auswirkung der veränderten Zellkinetik auf die Genauigkeit von Aberrations- raten in undifferenzierten Präparaten.	30
4. DISKUSSION	33
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. LITERATUR	45
7. ANHANG	
Abbildungen	54
Tabellen	64
8. DOKUMENTATION	71

1. EINLEITUNG

Chromosomenuntersuchungen bei Personen mit überdurchschnittlicher Chemikalienbelastung sind seit den ersten Studien dieser Art (CONNEN, LANSKY-1961 / ARRIGHI et al.-1962) zu einer beliebten Methode des unmittelbaren Nachweises von Mutagenität beim Menschen geworden. Angesichts der engen Beziehung zwischen Mutagenität und der malignen Entartung (AMES, DURSTON, YAMASAKI, LEE-1973 / u.v.a.) hat diese Methode eine zusätzliche praktische Bedeutung gewonnen.

Voraussetzung für eine relevante In-vivo-Untersuchung beim Menschen ist die schnelle, unkomplizierte Gewinnung von Untersuchungsmaterial, also teilungsfähiger menschlicher Zellen in ausreichender Menge, weiterhin eine relativ einfache labortechnische Handhabung des Untersuchungsgutes und eine einheitliche, aussagekräftige Interpretation der Untersuchungsergebnisse. Fast alle diese Forderungen werden von der Lymphozytenkultur aus dem peripheren Venenblut chemisch belasteter Probanden in nahezu idealer Weise erfüllt.

Da die Chromosomen einer unmittelbaren lichtmikroskopischen Betrachtung jedoch nur während der Kernteilung (Mitose) zugänglich sind, die Proliferation der stimulierten Lymphozyten aber unkoordiniert verläuft, ergibt sich die Schwierigkeit, daß zum Beobachtungszeitpunkt eine mehr oder minder große Anzahl von Zellen bereits mehr als eine DNA-Replikation durchlaufen

hat. Die Vorstellung, daß durch Mutagene hervorgerufene Chromosomenschäden zum größten Teil in der ersten Metaphase nach der Einwirkung sichtbar werden, während sie sich dann im Laufe der weiteren Proliferation auf Grund von Repair- und Selektionsmechanismen der Auffindung durch den Untersucher entziehen, veranlaßte eine Reihe von Autoren die Zuverlässigkeit der Methode in Frage zu stellen.

So fanden SCHINZEL und SCHMID (1976) bei Patienten die mit bekannten, zum Teil hoch mutagenen Zytostatika behandelt worden waren, keine nennenswerte Erhöhung der Aberrationsraten in den entsprechenden Blutkulturen. Dies stand eindeutig im Widerspruch zu zahlreichen Studien der letzten 20 Jahre, in denen die Mutagenität verschiedener Chemotherapeutika und anderer Stoffe nachgewiesen worden war (GEBHART-1973 /KILIAN, PICCIANO-1976/ und andere).

Die Frage nach dem Schicksal der Aberrationen, welche in den ersten Metaphasen nach Mutageneinwirkung sichtbar werden, im Laufe der folgenden Replikationszyklen, hatte bereits früher Anlaß zu Diskussionen gegeben. So berichteten EVANS (1970) und EVANS, O'RIORDAN (1975) über eine Abnahme von Chromatidtypaberrationen und eine Zunahme von Chromosomentypaberrationen in zweiten und dritten Metaphasen. (Die Begriffe 1./2./3. Mitosen werden in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit dem internationalen Schriftgut als Kurzbezeichnungen für jene Metaphasen verwendet, die zum Beobachtungszeitpunkt in der Kultur eine, zwei oder drei DNA-Replikationen vollzogen haben.)

Die Überlegung, daß das Auftreten zweiter und dritter Mitosen eng mit der Kulturzeit korreliert, und daß durch die Einbeziehung solcher Mitosen in die Auswertung das Ergebnis ihrer Untersuchungen möglicherweise verfälscht werden könnte, veranlaßte viele Autoren, der 48-Stunden-Kultur als relativ kurzer Kulturzeit den Vorrang zu geben. (BAUCHINGER, SCHMID-1969/ NIELSEN et al.-1969/ BLOOM-1972/ BUCKTON, EVANS-1973/ KILIAN, PICCIANO - 1976).

Andere Arbeitsgruppen hatten versucht, das Problem über die Erforschung des Zellzyklusverhaltens der T-Lymphozyten zu lösen. In neuerer Zeit wurden diese proliferationskinetischen Studien wieder aufgenommen, zumal die komplizierte autoradiographische Methode (TAYLOR-1957) zwischenzeitlich durch die sehr viel einfachere Bromdesoxyuridin-Giemsa-Färbung (LATT-1973/ LATT-1974/ KORENBERG, FRIEDLENDER-1974/ WOLF, PERRY-1974) ersetzt worden ist. Ziel all dieser Studien war es, jene Kulturzeit zu finden, in der sich ausreichend viele erste Mitosen, aber nur sehr wenige zweite und dritte Mitosen ansammeln.

Auch hier zeigte die 48-Stunden-Kultur gegenüber längeren Kulturzeiten bessere Ergebnisse. So fanden sich in 72-Stunden-Kulturen 25% erste Mitosen (BEEK, OBE-1979/ OBE, NATARAJAN-1980). CROSSEN und MORGAN wiesen darauf hin, daß sich auch in 48-Std.-Kulturen nur 47% erste Mitosen befinden (1977). Sie glaubten deshalb (1977) mit Kulturzeiten zwischen 38-40 Stunden bessere Ergebnisse erzielen zu können. Wegen der geringen Zahl auffindbarer Metaphasen im Präparat gaben dieselben Autoren ein

Jahr später die Kulturzeit mit 42 Stunden an(CROSSEN,MORGAN-1978).An diesem Beispiel zeigt sich die besondere Problematik:

Einerseits besteht die Befürchtung,durch längere Kulturzeiten eine Verfälschung des Aberrationsspektrums zu erzeugen und dadurch die Gültigkeit der Aussagen und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gefährden,andererseits sind ausreichend lange Kulturzeiten unabdingbar,um durch die Anwesenheit vieler Metaphasefiguren eine schnelle und zuverlässige Auswertung vornehmen zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollten an bromdesoxyuridinmarkierten Metaphasen,die eine exakte Zuordnung zu ersten,zweiten oder dritten Mitosen gestatten,aus 72-Stunden-Kulturen,welche aus dem Blut zytostatisch behandelter Patienten stammten,folgende Fragen untersucht werden,die bei den Studien anderer Autoren nicht berücksichtigt waren:

- 1.Wie verteilt sich das gefundene Aberrationsspektrum auf erste ,zweite und dritte Mitosen,die innerhalb einer Kultur nebeneinander beobachtet und dank der Bromdesoxyuridin-Markierung unterschieden werden können?
- 2.Wie wirkt sich das wiederholte Einwirken von Mutagenen (hier der Zytostatika)auf die Bruchraten und die vorgefundenen Aberrationen in ersten,zweiten und dritten Metaphasen aus?

3. Wie groß ist tatsächlich die "Verfälschung" der Ergebnisse durch die Anwesenheit zweiter und dritter Mitosen in unmarkierten Präparaten?
4. Wie wirkt sich die wiederholte Einwirkung von Clastogenen auf die Proliferationskinetik der T-Lymphozyten aus?
5. Sind die in der Literatur an gesunden Probanden erhobenen Werte über das Proliferationsverhalten von T-Lymphozyten auf die Zellkinetik chemisch belasteter Probanden anwendbar?

2. Material und Methode

2.1. Patientengut:

Im Rahmen einer größeren zytogenetischen Studie des Institutes für Humangenetik und Anthropologie der Universität Erlangen (GEBHART, LÖSING, WOPFNER-1980 / GEBHART, WINDOLPH, WOPFNER-in press) wurden bei Patienten der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen, welche sich dort nach operativer Entfernung eines Karzinoms im Kolon- oder Rektumbereich einer standardisierten zytostatischen Intervalltherapie unterzogen, Chromosomenuntersuchungen vorgenommen.

In die Studie wurden nur solche Personen einbezogen, bei denen die Indikation für eine gleichzeitige oder frühere Strahlenbehandlung nicht gegeben war. Die Zytostase setzte je nach Verlauf der Wundheilung und des Allgemeinzustandes des Patienten zwischen dem achten und vierzehnten Tag post operationem ein. Folgende Substanzen kamen dabei in Kombination zur Anwendung:

5-Fluoruracil

Methyl-CCNU

Vincristin

(Einzelheiten über die verwendeten Substanzen, ihre Dosierung sowie das Schema der Intervalltherapie sind der Abbildung 1 im Anhang zu entnehmen.)

Jedem Patienten wurde nach Möglichkeit vor und nach jedem Therapieschub peripheres Venenblut entnommen. Je 10 ml Blut wurden mit 50 E Heparin-Natrium (Ventren®) versetzt und im sterilen Glascontainer bei + 5°C (Kühlschrank) über etwa 24 Stunden aufbewahrt, da sich zeigte, daß sich frisch entnommenes Menschenblut weniger gut kultivieren läßt.

2.2. Kulturbedingungen:

Das Ansetzen der Lymphozytenkulturen erfolgte unter streng sterilen Bedingungen.

Dabei wurden pro Kultur 4,5 ml Ham's F 10 Medium (seromed) mit 0,5 ml fetalen Kälberserum (Ass.Biomedic Systems Inc.) und 600 I.E.Penicillin G pro Milliliter versetzt. Die in 15 Tropfen Vollblut enthaltenen T-Lymphozyten wurden durch drei Tropfen einer definierten Phytohämagglutininlösung (PHA purified Wellcome) zur Proliferation stimuliert. Zur Beurteilung des Zellzyklusverhaltens wurde weiterhin jeder Kultur von Anfang an 5-Bromdesoxyuridin in einer Endkonzentration von $2,2 \times 10^{-5}$ mol/l zugesetzt.

Die Kulturen wurden bei völliger Dunkelheit über 72 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach 70 Stunden erfolgte die Blockierung der Mitosen in der Metaphase durch Einbringen von Colcemid (8×10^{-7} g/ml) in den Kulturansatz.

Pro Patient und Blutentnahme wurden zwei Parallelkulturen angesetzt um eventuell auftretende kulturbedingte Artefakte sofort zu erkennen.

Nach Ablauf der Kulturzeit wurden die Zellen durch vorsichtiges Zentrifugieren gesammelt und einer hypotonen Behandlung mit 0,075 M KCl-Lösung unterzogen. Die Fixation der Metaphasen mit Methanol:Eisessig(3:1) und das Anfertigen der Präparate erfolgte nach der von MOORHEAD et al.(1960) beschriebenen Methode.

2.3.Färbung:

Die von PERRY und WOLF (1974) angegebene Färbemethode zur Darstellung von Schwesterchromatidaustauschen(SCE) eignet sich durch das spezifische Erscheinungsbild der Metaphasen, die während der Kulturzeit eine, zwei, drei oder vier DNA-Re-

plikationen vollzogen haben, auch hervorragend zur Bestimmung der Proliferationskinetik (SCHNEIDER, TICE, KRAM-1978). (Die Abbildungen 2-4 im Anhang zeigen schematisch das typische Färbemuster solcher bromdesoxyuridinmarkierten Metaphasefiguren.)

Die luftgetrockneten Präparate wurden für 10 Minuten in den Hoechst-Farbstoff 33258-Fluorochrom (Bisbenzimid) eingebracht und dann mit gepuffertem Wasser von pH 6,8 (nach SÖRENSEN) gespült. Nach einer 30-minütigen Bestrahlung mit UV-Licht von 254×10^{-9} m Wellenlänge, wobei die Präparate mit gepuffertem H_2O überschichtet waren, wurden sie für 20 Minuten bei $60^\circ C$ in Saline sodium citrate 10-fach inkubiert und nach der Abkühlung mit 7%iger Giemsa-Lösung gefärbt.

Nach mindestens 24-stündiger Lufttrocknung erfolgte die Einbettung zu Dauerpräparaten mit Eukitt.

2.4 Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop bei 1250-facher Vergrößerung.

Zu Beginn der Studie lagen alle Präparate bereits vor. Sie waren mit einem Nummernschlüssel versehen, damit der Untersucher keinerlei Rückschlüsse auf Patientendaten und Zeitpunkt der Blutentnahme ziehen konnte (Blindauswertung). In die Wertung genommen wurden nur Präparate, bei denen folgende Bedingungen erfüllt waren:

- Die vorgefundenen Metaphasen mußten sich auf Grund ihrer spezifischen Färbemuster eindeutig dem jeweiligen Zellzyklus zuordnen lassen.
- Die Metaphasen mußten in ihrem Chromosomenbestand vollzählig sein.
- Die Ausbreitung der Chromosomen in der Äquatorialplatte der Metaphase auf dem Präparat mußte so beschaffen sein, daß ein Erkennen und Beurteilen der einzelnen Chromosomen möglich war.

-Die Präparate einer Kultur mußten eine ausreichende Anzahl von Metaphasen 1./2. und 3. Mitosen enthalten.

Der letzte Punkt erwies sich als außerordentlich schwierig, so daß sich der Untersucher auf die Auswertung von jeweils 50 Metaphasen pro Zellzyklus und Präparat beschränken mußte. In Ausnahmefällen konnte bei den dritten Mitosen, bedingt durch die Proliferationskinetik der betreffenden Kultur, auch diese Zahl nicht gefunden werden.

Als Aberrationen wurden registriert:

1. Einzelbruchereignisse:

B' : Chromatidbrüche

B'' : Isochromatidbrüche- e i n Bruchereignis betrifft beide Chromatiden.

Doppelbruchereignisse die sich nicht zweifelsfrei von Isochromatidbrüchen abgrenzen ließen, wurden im Interesse einer möglichst genauen Bruchratenermittlung als Einzelbruch gewertet.

2. Zweibruchereignisse:

E' : Chromatidaustausch- imponiert im mikroskopischen Bild als Translokationskreuz.

E'' : Chromosomenaustausche:

- Dizentrische Chromosomen mit azentrischem Fragment
- Atypische Translokationschromosomen
- Ringchromosomen

3. Festgehalten wurden weiterhin numerische Abweichungen, soweit sie eine Erhöhung der Chromosomenzahl mit sich brachten.

Nicht bewertet wurden:

- Achromatische Läsionen ("Gaps"): Da das Erkennen solcher lokaler Achromasien besonders in den blaß gefärbten Chromatidabschnitten bei der Bromdesoxyuridinfärbung sehr schwierig ist und somit eine große Irrtumsrate angenommen werden mußte, wurde diese Art der Aberration bei der Auswertung nicht berücksichtigt.
- Schwesterchromatidaustausche : Da sich eine frühere Studie (GEBHART, WINDOLPH, WOPFNER-in press) sehr ausführlich mit dem Auftreten von Schwesterchromatidaustauschen bei zytostatisch behandelten Patienten beschäftigt, wurde auf eine neuerliche Auswertung dieser Aberrationen verzichtet.
- Numerische Abweichungen, die eine Verminderung des Chromosomensatzes mit sich brachten, wurden nicht registriert, da artefizielle Verluste von Chromosomen nicht auszuschließen waren.

3. ERGEBNISSE

3.1. Aberrationsverhalten von T-Lymphozyten, die während der Kulturzeit eine, zwei oder drei DNA-Replikationen vollzogen haben, in Abhängigkeit von der mutagenen Belastung

3.1.1. Grundlagen der Ergebnisdarstellung:

Den Ergebnissen liegen die Auswertungen von 3500 Metaphasen, die den Auswahlkriterien (siehe 2.4) genügten, von T-Lymphozyten aus dem peripheren Venenblut von 25 Patienten aus unterschiedlichen Therapiestadien zugrunde.

Pro Kultur wurden, soweit möglich, jeweils 50 Metaphasen von 1./2. und 3. Mitosen hinsichtlich ihres Aberrationsspektrums untersucht.

Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis des zugehörigen Blutabnahmetermins. Um die gefundenen Ergebnisse jedoch übersichtlich darstellen zu können, wurde nachträglich eine Gruppenbildung vorgenommen, wobei als Zuordnungskriterium die jeweiligen Therapiezyklen gewählt wurden, in denen die Blutabnahme erfolgte.

Ein weiteres wichtiges Kriterium, das bei der Zuordnung der Einzelpräparate zu einer Gruppe beachtet wurde, war die Frage, ob die Blutentnahme unmittelbar nach einem fünftägigen Zytostaseschub erfolgte oder nach einer 28-tägigen Therapiepause.

(Einzelheiten über das Therapieschema sind Abbildung 1 im Anhang zu entnehmen.)

Die Gruppen gliedern sich im einzelnen wie folgt:

Gruppe 1 : 600 Metaphasen von vier Patienten.

Blutentnahme: Vor Beginn der Zytostase-
Nullkontrollen.

Gruppe 2 : 750 Metaphasen von fünf Patienten.

Blutentnahme: Unter dem ersten und zweiten
Therapiezyklus, jeweils nach einer
28-tägigen Therapiepause.

Gruppe 3 : 450 Metaphasen von drei Patienten.

Blutentnahme: Unter dem ersten und zweiten
Therapiezyklus, jeweils unmittelbar
im Anschluß an einen fünftägigen
Therapieschub.

Gruppe 4 : 1200 Metaphasen von neun Patienten.

Blutentnahme: Während des dritten oder eines der
folgenden Therapiezyklen, jeweils
nach einer 28-tägigen Therapiepause.

Gruppe 5 : 550 Metaphasen von vier Patienten.

Blutentnahme: Während des dritten oder eines der
folgenden Therapiezyklen, jeweils
unmittelbar im Anschluß an einen
fünftägigen Zytostaseschub.

3.1.2. Verteilung der Bruchraten in 1./2. und 3. Mitosen in Abhängigkeit von der mutagenen Belastung.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, wurde die bereits früher nachgewiesene Steigerung der Bruchraten im Chromosomensatz der T-Lymphozyten zytostatisch behandelter Patienten als unmittelbare Folge einer vermehrten Mutageneinwirkung auch in vorliegender Studie gefunden (GEBHART, LÖSING, WOPFNER-1980).

Durch die getrennte Untersuchung der verschiedenen Mitosearten (1./2./3. Mitosen), unabhängig von der Proliferationskinetik und somit von der Häufigkeit ihres Auftretens im Präparat zeigte es sich, daß der Anstieg der Bruchraten unter der Therapie ein generelles Ereignis ist, an dem alle auftretenden Mitosearten beteiligt sind.

Abb. 5 zeigt die Verteilung der Bruchraten im Verlauf der Zytostase. Auffällig ist der starke Anstieg in den ersten Mitosen, wo Steigerungen der Bruchraten vom 4- bis 8-fachen der Nullkontrolle zu verzeichnen sind.

In zweiten und dritten Mitosen sind die Bruchraten ziemlich gleich um das 3,5- bis 5,5-fache des Nullwertes erhöht.

Vergleicht man die Bruchraten innerhalb einer Gruppe (Abb. 6), so findet man auch dort in den ersten Mitosen die höchsten Werte, während in dritten Mitosen die geringsten Zuwachsraten zu verzeichnen sind. Selbst im ungünstigsten Fall findet sich jedoch eine Erhöhung der Bruchrate um mehr als

das dreifache des Nullkontrollenwertes, was als beweisend für mutagene Aktivität angesehen wird.

Die Einzelwerte bezüglich 1./2. und 3. Mitosen innerhalb jeder Gruppe liegen immer höher als die vergleichbaren Werte einer darunter liegenden Gruppe mit einer geringeren mutagenen Belastung. So finden sich in jenen Gruppen, bei denen die Blutentnahme nach einer 28-tägigen Therapiepause erfolgte, in allen Mitosearten geringere Bruchraten als bei ihrem Äquivalent, bei dem die Blutentnahme unmittelbar nach einem fünftägigen Therapieschub vorgenommen wurde, jedoch höhere Bruchraten als in den Gruppen mit geringerer zytostatischer Belastung.

3.1.3. Aberrationsspektrum der untersuchten Metaphasen.

86% der gefundenen Aberrationen stellen Chromatidbruchereignisse dar. Davon sind 55% Einzelbrüche, der Rest betrifft beide Chromatiden, ohne daß hierbei eine Unterscheidung zwischen Isochromatidbrüchen und Doppelbruchereignissen möglich war.

Die Auswertung zeigte, daß bei den einzelnen Mitosearten (1./2./3. Mitosen) jeweils ein bestimmter Aberrationstyp besonders dominiert (Tab. 3-5).

So fanden sich in den ersten Mitosen 92% aller gefundenen Chromatidaustausche, die im mikroskopischen Bild als

Translokationskreuze imponieren und 14% aller gefundenen Aberrationen darstellen. Die verbleibenden 8% verteilen sich auf zweite und dritte Mitosen.

Unter der Therapie konnte in den ersten Mitosen eine deutliche Zunahme an Chromatidaustauschen beobachtet werden. Sie machen bei hochbelasteten Patienten (Gruppe 5) 46% aller gefundenen Aberrationen in ersten Mitosen aus (Abb. 7).

In den zweiten Mitosen lag die größte Zuwachsrate bei den "Isochromatidbrüchen", bei denen angenommen werden kann, daß es sich zum größten Teil um reduplizierte Einzelbruchereignisse handelt.

Im Vergleich zu den Nullkontrollen ist eine Steigerung um das 4- bis 16-fache zu verzeichnen (Abb. 8).

Bei den dritten Mitosen fanden sich Chromatidbrüche in größerer Zahl (bis zum 26-fachen des Nullwertes).

Da die Chromatid- und Chromosomenaustausche in den zweiten und dritten Mitosen von ganz besonderem Interesse sind, soll vermerkt werden, daß neben den in die Wertung genommenen Austauschen zusätzlich vereinzelt Translokationen in zweiten Mitosen beobachtet wurden, die jedoch wegen Unvollständigkeit des zugehörenden Chromosomensatzes nicht gewertet wurden.

Auch fanden sich in zweiten und dritten Mitosen Chromosomen, bei denen der Verdacht auf das Vorliegen einer Atpyie be-

stand, sie sich infolge der verwendeten Färbung (keine Bänderung) nicht nachweisen ließ, so daß keine Aberrationswertung erfolgte.

3.1.4. Verteilung des Anteils aberranter Zellen in ersten, zweiten und dritten Mitosen im Verlauf der Therapie.

Im Gegensatz zu den Verteilungen der Bruchraten, bei denen die ersten Mitosen am stärksten betroffen sind, erfolgt der größte Zuwachs bei der Anzahl der aufgefundenen aberranten Metaphasen bei den dritten Mitosen. Unter der Therapie steigt die Zahl der geschädigten Zellen vom 8-bis zum 18-fachen des Nullwertes.

Bei den zweiten Mitosen ist eine Steigerung um das 4-bis 6,5-fache des Kontrollwertes zu beobachten.

Der geringste Anstieg ist bei den ersten Mitosen zu verzeichnen. Die Anzahl aberranter Zellen steigt dort maximal bis zum 4,5-fachen des Nullkontrollenwertes. Dieser Anstieg wird allerdings schon früh erreicht (in Gruppe 3, also unmittelbar nach einem fünftägigen Therapieschub im ersten Therapieintervall), um dann im Verlauf der weiteren Therapie nicht mehr weiter anzusteigen (Abb. 9).

Da sich mutagene Einwirkungen in Zellen nicht zwangsläufig als lichtmikroskopisch sichtbare Chromosomenaberrationen

manifestieren müssen, wurde untersucht, ob bei den gefundenen Metaphasen möglicherweise andere Auffälligkeiten zu beobachten waren.

Der Vergleich zwischen der Anzahl an Metaphasen, die im Präparat gefunden wurden und jenen, die dann endgültig in die Wertung genommen wurden (Auswahlkriterien siehe 2.4), ergab, daß nahezu konstant in allen Präparaten unabhängig von der vorherrschenden Proliferationskinetik, dem Therapie-stand oder der untersuchten Mitoseart von drei aufgefundenen Metaphasen zwei auswertbar waren. Der Rest mußte wegen präparationsbedingter Artefakte (Verklumpung der Chromosomen, Färbemängel, Unvollständigkeit) verworfen werden.

Auffällig waren nur die Präparate eines Patienten, dessen Blut vor dem neunten Therapieschub gewonnen und kultiviert worden war. Während die ersten und zweiten Mitosen normal auswertbar waren, konnten bei den dritten Mitosen von fünf gefundenen Metaphasen nur eine in die Wertung genommen werden. Bei den übrigen zeigte sich fast ausnahmslos eine erhebliche numerische Unvollständigkeit des Chromosomensatzes (35-40 Chromosomen).

Die Frage, ob hier möglicherweise in den dritten Mitosen eine Zellschädigung im Sinne eines Membrandefektes zum Tragen gekommen sein könnte, sei zur Diskussion gestellt.

3.1.5. Unmittelbare Verlaufsbeobachtung der Therapie bei vier Patienten.

Nach Decodierung der Präparate zeigte sich, daß von vier Patienten Auswertungsergebnisse aus jeweils zwei verschiedenen Abschnitten der Therapie vorlagen.

Da die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse in Form statistischer Mittelwerte zwar die einzig sinnvolle Art ist, andererseits gerade bei Beobachtungen in biologischen Systemen mehr oder minder große Variationsbreiten bei den Einzelergebnissen hingenommen werden müssen, bot sich hier die Gelegenheit, die statistischen Aussagen hinsichtlich ihrer Gültigkeit für den realen Einzelfall nachzuprüfen.

Bereits die einfache Auflistung der Einzelergebnisse (Dokumentation Liste 5/6) zeigt, daß in allen vier Fällen die Bruchraten unter der Therapie ansteigen und zwar ausnahmslos sowohl in ersten, als auch zweiten und dritten Mitosen.

Nunmehr konnte weiterhin überprüft werden, ob die Höhe der tatsächlich beobachteten Steigerungen der Bruchraten mit den in der Arbeit mitgeteilten und diskutierten statistischen Werte übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde für jeden Patienten einzeln festgestellt, welcher statistischen Gruppe (siehe 3.1.1.) die beiden gefundenen Einzelergebnisse zugeordnet worden sind. Der Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten dieser Gruppen wurde mit der tatsächlich be-

obachteten Steigerung der Bruchraten verglichen. Dies getrennt für erste, zweite und dritte Mitosen.

Es zeigte sich, daß von den so gewonnenen zehn Vergleichswerten (bei zwei Patienten waren die dritten Mitosen nicht auswertbar) acht eine gute bis sehr gute Übereinstimmung zwischen der Realität und der Statistik erbrachten (Tab. 6). Die Abweichungen bei den verbleibenden zwei Werten (erste Mitosen bei Patient 3 und dritte Mitosen bei Patient 4) können dadurch erklärt werden, daß jeweils eine der tatsächlich ermittelten Aberrationsraten im negativen 2- σ -Bereich der den statistischen Mittelwert zugrundeliegenden Verteilung zu finden ist. (Einzelheiten siehe Dokumentation Liste 5/6). Beide Werte liegen dabei immer noch innerhalb der zulässigen Abweichung.

Das bei den vier Patienten vorgefundene Aberrationsspektrum zeigt in seiner Gesamtheit die gleiche Tendenz wie die statistische Zusammenfassung aller Einzelergebnisse:

In den ersten Mitosen finden sich unter der Therapie die größten Zuwachsraten bei den Chromatidaustauschen (4-fache des Ausgangswertes), in den zweiten Mitosen bei "Isochromatidbrüchen" (3,3-fache des Ausgangswertes).

Insgesamt dürfte durch diese unmittelbare Verlaufskontrolle gezeigt sein, daß die Aussagen der vorliegenden Arbeit, die sich zwangsläufig auf die statistisch aufbereiteten Daten von individuell unterschiedlichen Patienten stützen müssen, auch für den konkreten Einzelfall Gültigkeit besitzen.

3.1.6. Auftreten von Zellen, die in 72-Stunden vier
DNA-Replikationen vollzogen haben.

Vierte Mitosen wurden in den Präparaten hin und wieder vereinzelt gefunden.

In zwei Fällen traten relativ vermehrt vierte Mitosen in Erscheinung. Ohne Wertung der Aussage seien die Ergebnisse mitgeteilt:

1. Patient: in 35 vierten Mitosen werden 5 Chromatidbrüche beobachtet. Das entspricht einer Bruchrate von 0,14. Die Gesamtbruchrate der Kultur lag bei 0,32.
2. Patient: in 13 vierten Mitosen findet sich ein Bruchereignis. ($B/M = 0,08$; Gesamtbruchrate = 0,18)

3.2.Proliferationskinetik von T-Lymphozyten aus dem Blut zytostatisch behandelter Patienten in Abhängigkeit von der mutagenen Belastung.

3.2.1.Verteilung erster,zweiter und dritter Mitosen unter der Therapie

Jede,bei der Auswertung der Präparate gefundene Metaphase, die sich aufgrund ihrer Färbung eindeutig als 1./2.oder 3.Mitose,in seltenen Fällen auch als 4.Mitose identifizieren ließ,wurde erfaßt.

Die prozentuale Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Mitosen wurde untereinander verglichen und dem jeweiligen Therapiestand des betreffenden Patienten zugeordnet(Tab.7). Die gebildeten Gruppen sind mit denen bei der Aberrationsauswertung identisch.

Als unmittelbare Auswirkung der Zytostase kann eine Verlangsamung des Zellzyklus beobachtet werden,was dazu führt, daß mit Fortschreiten der Mutageneinwirkung sich nach 72 Stunden Kulturzeit in immer größerer Zahl Lymphozyten finden,die während dieser Zeit nur eine DNA-Replikation vollzogen haben(erste Mitosen).

Gleichzeitig kommt es zu einer analogen Abnahme von dritten Mitosen(Abb.10),was dazu führt,daß bei Präparaten von

Patienten, die bereits häufigen Therapieschüben ausgesetzt waren, eine hinreichende Zahl solcher Zellen zur Bestimmung der Aberrationsraten nicht mehr aufzufinden ist.

Von diesen Schwankungen völlig unbetroffen sind die zweiten Mitosen, die sich stets in gleichbleibender Häufigkeit repräsentieren.

3.2.2. Auswirkungen der veränderten Zellkinetik auf die Genauigkeit von Aberrationsraten in undifferenzierten Präparaten.

Bei der getrennten Bestimmung der Bruchraten in differenzierten Präparaten (Bromdesoxyuridin-Giemsa-Methode) an Hand einer definierten Anzahl erster, zweiter und dritter Mitosen spielt die Zellkinetik der betreffenden Kultur nur insoweit eine Rolle, als sie das Auffinden der gesuchten Metaphasen erleichtert oder erschwert, in Einzelfällen auch unmöglich machen kann.

Bei der Auswertung konventionell mit Orcein gefärbten Präparaten ist eine Zuordnung der gefundenen Metaphasen in erste, zweite und dritte Mitosen nicht möglich. Zur Ermittlung der Abweichung der Aberrationsraten, welche aus

solch einer gemischten Anzahl verschiedener Mitosen hervorgeht und den Ergebnissen, die sich bei selektionierter Auswertung nur erster Mitosen finden, wurden alle Metaphasen in der Reihenfolge ihrer zufälligen Auffindung im Präparat durchnummeriert, unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu den einzelnen Fraktionen. Aus den ersten 100 Metaphasen wurde dann die Bruchrate bestimmt, in der Vorstellung, daß das so gefundene Ergebnis mit der Bruchrate aus einem undifferenzierten Präparat identisch ist. Anschließend erfolgte der Vergleich mit der Bruchrate, welche aus 50 ersten Mitosen errechnet wurde.

Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit vom Therapiestand des Patienten (Abb. 11) und damit von der Proliferationskinetik der betreffenden Kultur.

Die größte Abweichung findet sich prozentual in den Nullkontrollen. Mit zunehmender Therapiedauer gleichen sich die Werte immer mehr an um schließlich nur noch 2% voneinander zu differieren.

4. DISKUSSION

Im Gegensatz zu den von SCHINZEL und SCHMID (1976) veröffentlichten Ergebnissen, die keine nennenswerten Erhöhungen der Aberrationsraten bei zytostatisch belasteten Patienten fanden, wurde auch in vorliegender Studie die bereits früher nachgewiesene Steigerung der Bruchraten im Chromosomensatz der T-Lymphozyten bei chemisch belasteten Patienten als unmittelbare Folge einer vermehrten Mutagenwirkung gefunden (GEBHART, LÖSING, WOPFNER-1980).

Die clastogene Wirkung der eingesetzten Substanzen war durch zahlreiche Literaturangaben belegt (TAYLOR, HAUT und TUNG-1962/BELL, WOLF-1964/KIHLMANN-1966/HAMPEL et al.-1977/FRÄNZ-1970/MAIER, SCHMID-1976/HEDDLE et al.-1977/MÜLLER et al.-1978/TATES et al.-1976/1977-/LAMBERT et al.-1978 / und andere).

Durch die Bromdesoxyuridinmarkierung der Zellen konnte das Aberrationsspektrum bei jenen Zellen, die während der 72-stündigen Kulturzeit eine, zwei oder drei DNA-Replikationen durchgemacht hatten, getrennt ermittelt werden. Dabei zeigte es sich, daß zu der Erhöhung der Bruchraten unter der Therapie alle auftretenden Mitosen beitragen und die Proliferationskinetik der betreffenden Kultur nur sekundäre Bedeutung erlangt.

Allerdings fällt auf, daß erste Mitosen mit einer Steigerung bis zum 8-fachen des Nullkontrollwertes stärker betroffen scheinen, als zweite und dritte Mitosen, bei

denen die Bruchraten ziemlich gleichmäßig um das 3,5-fache bis 5,5-fache des Ausgangswertes ansteigen.

Eine mögliche Erklärung findet sich in einer sehr starken Zunahme an Chromatidaustauschen(Translokationskreuze) in den ersten Mitosen. Bei Probanden, welche drei oder mehr Therapiezyklen hinter sich hatten, machten die Chromatidaustausche bis zu 46% des gefundenen Aberrationsspektrums aus. Da es sich bei Chromatidaustauschen um definierte Zweibruchereignisse handelt, bedingt ihr Auftreten zwangsläufig eine entsprechende Erhöhung der Bruchraten. In zweiten und dritten Mitosen finden sich Chromatidaustausche nur vereinzelt, wenngleich es bemerkenswert ist, daß sie überhaupt auftreten. Stattdessen beobachtet man ein Ansteigen jener Bruchereignisse, die beide Chromatiden betreffen (bis zum 12-fachen des Nullwertes). Dies erhöht die Bruchraten jedoch nicht in dem Maße, wie dies die Chromatidaustausche in ersten Mitosen tun. Da zwischen Isochromatidbrüchen und echten Doppelbruchereignissen nicht unterschieden werden kann, wurden definitionsgemäß alle Brüche, die sich über beide Chromatiden eines Chromosoms erstreckten, als Einzelbruchereignis in die Wertung aufgenommen. Chromosomenaustausche und hier besonders atypische Translokationschromosomen werden mit der verwendeten Methode nur dann erfaßt, wenn die Atypie so augenfällig ist, daß sie beim Betrachten des lichtmikroskopischen Bildes bemerkt wird.

Die Bruchraten in zweiten, teilweise auch dritten Mitosen, sind daher in vorliegender Arbeit eher als unterreprä-

sentiert zu werten. Es muß späteren Untersuchungen mit verfeinerten Techniken (z.B. Banding und Karyogrammanalysen) überlassen bleiben, hier genauere Aussagen machen zu können.

Die Chromatidaustausche als typische Aberrationen erster Mitosen und die "Isochromatidbrüche" zusammen mit Chromosomenaustauschen als vorherrschende Aberration zweiter und dritter Mitosen, läßt fast zwangsläufig an die Möglichkeit eines Entstehungszusammenhanges denken.

In der Tat ist die Vorstellung, daß aus einem Chromatidaustausch im weiteren Verlauf der Zellproliferation ein Doppelbruchereignis oder ein Chromosomenaustausch entstehen könnte, naheliegend. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um eine aktuelle Momentaufnahme des Aberrationsspektrums bei jenen Zellen handelt, die während der Einwirkung des Spindelgiftes Colcemid zwischen der 70. und 72. Stunde nach Kulturbeginn gerade in die erste, zweite oder dritte Zellteilung eintraten, also wohl unterschiedlich schnell proliferierende Lymphozytenpopulationen repräsentieren.

Wenn jedoch hinsichtlich der Proliferationskinetik solche, teilweise doch erheblichen Unterschiede bestehen, so muß die Frage gestellt werden, ob sich diese Unterschiede möglicherweise nicht auch in der Aberrationsanfälligkeit einzelner "Populationen" wiederfindet.

Diskutiert man diese Möglichkeit, so müßte zuerst der Begriff

"erste, zweite, dritte Mitose" hinsichtlich der Kulturzeit genauer definiert werden. So liegen alle "ersten Mitosen", die sich in den Präparaten von 72-Stunden-Kulturen finden, in 48-Stunden-Kulturen noch als Interphasekern vor, tragen also nicht zum dortigen Aberrationsspektrum bei. Andererseits existieren auch in 72-Stunden-Kulturen eine unbestimmbare Zahl von stimulierten Zellen, die erst bei Weiterführung der Kultur über 72 Stunden hinaus in ihre erste Zellteilung eintreten. Es ist denkbar, daß Zellen mit Chromosomenschäden ihren Proliferationszyklus verlangsamen, wobei dann das Ausmaß des Schadens für den Grad der Verzögerung bestimmend sein könnte.

Logische Konsequenz dieser spekulativen Betrachtungen müßte dann eine relativ lange Kulturzeit sein, um möglichst viele solcher schwergeschädigten, langsam proliferierenden Zellen zu erfassen.

In diesem Zusammenhang sei auf die bemerkenswerte Tatsache hingewiesen, daß die höheren Bruchraten bei den ersten Mitosen in der vorliegenden Studie ausschließlich auf das gehäufte Auftreten von Zweibruchereignissen (Chromatid austauschen) und Mehrfachschädigungen innerhalb einer Metaphasefigur zurückzuführen sind, nicht auf das vermehrte Auffinden aberranter Mitosen. Es ist ein nicht ohne weiteres zu erklärendes Phänomen, daß sich bereits nach kurzer Mutageneinwirkung, noch während des ersten und zweiten Therapiezyklusses, in den ersten Mitosen ein Maximalwert an aberranten Zellen einstellt, der sich im Laufe der weiteren Therapie

trotz sehr starker Steigerung der Bruchraten nicht verändert.

Inwieweit sich erste bez.zweite Mitosen einer 48-Stunden-Kultur in der 72-Stunden-Kultur als zweite bez. dritte Mitosen wiederfinden, ob und wie sich dabei das Aberrationsspektrum verändert, kann aus den vorliegenden Befunden nicht sicher abgeleitet werden.

Die Möglichkeit, daß erste Mitosen mit einem Chromatidaustausch jede weitere Teilung einstellen, besonders bei asymmetrischen Translokationen, und daß Bruchereignisse in zweiten und dritten Mitosen Erstmanifestationen von bis dato mit der Methode nicht erfaßbaren DNA-Läsionen darstellen, ist ebenso denkbar. Für diese Vorstellung spricht beispielsweise auch das Auftreten von Chromatidaustauschen in zweiten und selbst dritten Mitosen.

Insgesamt dürfte dennoch gezeigt sein, daß die Vorstellung, daß sich Aberrationen ausschließlich in ersten Mitosen nach Einwirkung des Mutagens zeigen und sich dann infolge von Repair- und Selektionsmechanismen einer weiteren Betrachtung entziehen, nicht haltbar ist.

Ein weiteres Argument gegen die Verwendung der 72-Stunden-Kultur ist die in der Literatur oft vorgetragene verschwindend geringe Anzahl erster Mitosen in solchen Kulturen. So finden OBE und BEEK (1979) nur 25% erste Mitosen, MUTSCHINICK, RUZ und CASAS (1980) bei den auch von uns verwendeten Kultur-

medium Ham's mit fetalem Kälberserum sogar nur 2-5%. Selbst in 48-Stunden-Kulturen sind nach CROSSEN und MORGAN (1978) nur ca.50% erste Mitosen zu sehen. Alle diese proliferationskinetischen Aussagen beziehen sich jedoch auf das Zellzyklusverhalten von T-Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden. Die hier gefundenen Werte stellen sich völlig anders dar. Während die Nullwerte und die Werte zu Beginn der zytostatischen Behandlung mit ca.25% erster Mitosen den Angaben von BEEK und OBE entsprechen, ist unter der Therapie ein zunehmendes Ansteigen der Anzahl erster Mitosen bis zu 50% zu beobachten. Ursache hierfür ist eine Verlangsamung des Zellzyklusses durch die Zytostatika (GEBHART, SCHWANTZ, HARTWICH-1969-).

Die Kulturzeit für Lymphozytenkulturen aus dem Blut chemisch belasteter Patienten kann demzufolge nicht an den Ergebnissen bei gesunden Probanden gemessen werden.

Ausgehend von der Vorstellung, daß sich nur in ersten Mitosen Aberrationen finden und angesichts der Tatsache, daß der Zellzyklus bei chemisch belasteten Patienten in Abhängigkeit von der Stärke der Belastung verlangsamt ist, könnte der Einwand vorgebracht werden, daß die Erhöhung der Bruchraten unter der Therapie möglicherweise ganz oder zum größten Teil auf das Ansammeln geschädigter erster Mitosen zurückzuführen ist. Zwar ist es richtig, daß sich durch die Verzögerung des Zellzyklusses die Zahl an

ersten Mitosen vergrößert und daß sich in diesen ersten Mitosen jene Aberrationen finden, die für die Höhe der Bruchraten besonders gewichtig sind (Chromatidaustausche=definierte Zweibruchereignisse). Gleichzeitig und völlig unabhängig von der Proliferationskinetik steigen jedoch auch die Bruchraten in den zweiten und dritten Mitosen. Während hier das Ansteigen der Bruchraten mit dem gleichzeitigen Zuwachs an aberranten Mitosen einhergeht, bleibt bei den ersten Mitosen die Anzahl aberranter Lymphozyten konstant und nur der Schädigungsumfang innerhalb der Einzelzelle nimmt zu. Die Vorstellung, daß nur ungeschädigte Zellen weitere Teilungen durchführen, während geschädigte Zellen in der Interphase nach der ersten Mitose verweilen, ist so sicherlich nicht richtig.

Trotzdem bleibt aber die Tatsache bestehen, daß erste Mitosen die Chromosomenschäden am augenfälligsten und zuverlässigsten wiedergeben. Für die Abschätzung der Fehlerquote die sich ergibt, wenn in undifferenzierten Präparaten die Metaphasen ohne Kenntnis ihrer Generationszugehörigkeit ausgewertet werden, ist die zugrunde liegende Zellkinetik von Bedeutung. So finden sich in Nullkontrollen und zu Beginn der mutagenen Belastung in den einzelnen Kulturen ca. 25% erste Mitosen. Der Vergleich der Bruchraten undifferenzierter Metaphasen zu den Bruchraten aus ersten Mitosen zeigt eine Abweichung von 20%. Unter der Therapie wächst die Fraktion der ersten Mitosen

infolge der Verlangsamung des Zellzyklusses auf 50% aller gefundenen Metaphasen an. Die gefundenen Werte der Bruchraten weichen im statistischen Mittel nur noch 2% voneinander ab.

Die Erkenntnis, daß sich in 72 Stunden-Kulturen aus dem Blut chemisch belasteter Patienten mehr erste Mitosen finden, als bisher angenommen, in Verbindung mit der Tatsache, daß sich die Erhöhung der Bruchraten unter der Therapie auch auf zweite, dritte unter Umständen sogar vierte Mitosen erstreckt, zeigt, daß die so gefundenen Aberrationsraten genauso zuverlässig sind wie jene, die aus 48-Stunden-Kulturen ermittelt werden.

Da die Ausbeute verwertbarer Metaphasen in 48-Stunden-Kulturen und natürlich auch in allen Zellkulturen die noch kürzer bebrütet werden, erfahrungsgemäß oftmals so gering ist, daß eine Auswertung scheitert oder nur mit erheblichen Einschränkungen möglich ist, sollten die kurzen Kulturzeiten wo immer möglich, zugunsten einer schnelleren und zuverlässigeren Methode verlassen werden.

Für zukünftige Untersuchungen bietet sich die bromdesoxyuridinmarkierte 72-Stunden-Kultur an. Die einfache labor-technische Handhabung, die sich arbeits- und materialmäßig nur unwesentlich von den konventionellen orceingefärbten Zellkulturen unterscheidet, bietet eine Reihe von Vorteilen:

- durch die Besonderheiten der Färbung lassen sich die Aberrationsraten ausschließlich aus ersten Mitosen bestimmen,
- als zusätzliche Information kann gleichzeitig in den zweiten Mitosen die Rate an Schwesterchromatidaustauschen ermittelt werden,
- auf einfachste Weise kann die Proliferationskinetik der betreffenden Kultur ermittelt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

3500 Metaphaseplatten von T-Lymphozyten aus dem Blut von 25 Karzinompatienten der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen, die postoperativ nach einem standardisiertem Therapieschema zytostatisch behandelt wurden, dienten als Untersuchungsmaterial zum Auffinden von Chromosomenschäden. Durch Anwendung der Bromdesoxyuridin-Giemsa-Färbung konnte zwischen jenen Zellen unterschieden werden, die während der 72-stündigen Kulturzeit eine, zwei oder drei DNA-Replikationen vollzogen hatten. Es zeigte sich, daß die Zunahme der Bruchraten unter der Therapie gleichförmig erste, zweite und dritte Mitosen betraf, wobei erste Mitosen durch das zahlreiche Auftreten definierter Zweibruchereignisse (=Chromatidaustausche) etwas stärker betroffen scheinen. Die verwendete Färbemethode erlaubte ebenfalls eine Aussage bezüglich der Proliferationskinetik der Zellen in Kultur. Die gefundenen Ergebnisse zeigen eine zunehmende Verlangsamung des Zellzyklus unter der Mutageneinwirkung, mit der Folge einer relativen Vermehrung erster Mitosen. Dieser Befund widerlegt die Ansicht vieler Autoren, wonach in 72-Stunden-Kulturen aus dem Blut chemisch belasteter Probanden erste Mitosen die Minderheit der gefundenen Zellen darstellt und die Aberrationsraten dadurch ungenau wiedergegeben würden. Ein direkter Vergleich der Bruchraten aus ersten Mitosen mit den Bruchraten aus undifferenzierten Metaphasen zeigt, daß die "Verfälschung" der Aberrationsraten durch das Auftreten zweiter und dritter Mitosen so gering ist, daß sie vernachlässigt werden kann. Für zukünftige Studien empfiehlt sich deshalb die Anwendung der labortechnisch einfachen Bromdesoxyuridin-Giemsa-Färbung mit Auswertung ausschließlich erster Mitosen, oder wenn die geringe Fehlerquote in Kauf genommen wird, die undifferenzierte 72-Stunden-Kultur.

6.Literatur

- 1.ARRIGHI,F.E. , HSU,T.C. , BERGSAGEL,D.E.:
Chromosome damage in murine and human cells
following cytoxan therapy.
Tex.Rep.Biol.Med.20,545-549 (1962)

- 2.AUF DER MAUR,P. ,BERLINCOURT-BÖHNI,K.:
Human lymphocyte cell cycle:
Studies with the use of BrUdR
Humangenetik 49,209-15 (1979)

- 3.BAUCHINGER,M. ,SCHMID,E.:
Cytogenetische Veränderungen in weißen Blutzellen
nach Cyclophosphamidtherapie
Z.Krebsforschung 72,77-87 (1969)

- 4.BEEK,B. ,OBE,G.:
Sister chromatid exchanges in human leukocyte
chromosomes:spontaneous and induced frequencies
in early-and late-proliferating cells in vitro.
Human Genetics 49,51-61 (1979)

- 5.BEEK,B.:
Cell proliferation and chromosomal damage in
human leukocytes:Dicentrics and premature
chromosome condensations in first,second and
third mitoses after X-irradiations
In Vorbereitung

- 6.BELL,S. ,WOLFF,S.:
Studies on the mechanism of the effect of Fluor-
deoxyuridine on chromosomes.
Proc.nat.Acad.Sci.(Wash) 51,199-202 (1964)

7.BLOOM ,A.D.:

Induced chromosomal aberrations in man.
In:Advances in human genetics(H.Harris,
K.Hirschhorn eds.)pp.99-172.
New York:Plenum Press 1972

8.BUCKTON,K.E. ,EVANS,H.J.(eds.):

Methods for the analysis of human chromosome
aberrations.
Geneva:World Health Organisation 1973

9.CONEN,P.E. ,LANSKY,G.S.:

Chromosome damage during nitrogen mustard therapy
Br.Med.J.1961 II. 1055-1057

10.CRAIG-HOLMES,A.P. ,SHAW,M.W.:

Cell cycle analysis in asynchronous cultures us-
ing the BUdR-Hoechst technique.
Exp.Cell.Res. 99 ,76-87 (1976)

11.CROSSEN,P.E. ,MORGAN,W.F.:

Analysis of human lymphocyte cell cycle time in
culture measured by sister chromatid differential
staining
Exp.Cell.Res. 104, 453-457 (1977)

12.CROSSEN,P.E. ,MORGAN,W.F.:

Proliferation of PHA-and PWA-stimulated lymphocytes
measured by sister chromatid differential staining.
Cell.Immunol.32, 432-438 (1977)

13.CROSSEN,P.E ,MORGAN,W.F.:

Proliferation of PHA-stimulated lymphocytes
measured by combined autoradiography and sister
chromatid differential staining.
Exp.Cell Res. 118 ,423-427 (1979)

14. CROSSEN, P.E. , MORGAN, W.F.:
Occurrence of first division metaphases in
human lymphocyte cultures.
Hum.Genet. 41, 97-100 (1978)

15. EVANS, H.J.:
Population cytogenetics and environmental factors.
In: Human population cytogenetics (P.A. Jacobs,
W.H. Price, P. Law, eds.) pp. 191-216 Pfizer Medical
Monographs 5. Edinburgh: Edinburgh University Press (1970)

16. EVANS, H.J. , O'RIORDAN, M.L.:
Human peripheral blood lymphocytes for the
analysis of chromosome aberrations in mutagen tests
Mut. Res. 31, 135-148 (1975)

17. FRÄNZ, J.:
Chromosome aberration induced by antimetabolites.
In: Chemical mutagenesis in mammals and man
(F. Vogel, G. Röhrborn, eds.) Berlin, Heidelberg, New York:
Springer-Verlag (1970)

18. GEBHART, E. , SCHWANITZ, G. , HARTWICH, G.:
Zytogenetische Wirkungen von Vincristin auf mensch-
liche Leukozyten in vivo und in vitro.
Med. Klin. 51, 2366-2371 (1969)

19. GEBHART, E.:
The treatment of human chromosomes in vitro: results
In: Chemical mutagenesis in mammals and man
(F. Vogel, G. Röhrborn, eds.) Berlin, Heidelberg, New York:
Springer-Verlag (1970)

20. GEBHART, E.:
Chromosomenaberrationen bei chemisch belasteten
Patienten.
Ärztl. Praxis 25, 665-666 (1973)

21. GEBHART, E.:
Chemische Mutagenese
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York (1977)
22. GEBHART, E. , LÖSING, J. , WOPFNER, F.:
Chromosome studies on lymphocytes of patients under
cytostatic therapy
I. Conventional chromosome studies in cytostatic
interval therapy.
Hum. Genet. 55 , 53-63 (1980)
23. GEBHART, E. , WINDOLH, B. , WOPFNER, F.:
Chromosome studies of lymphocytes of patients under
cytostatic interval therapy
II. Studies using the BUDR-labelling technique in
cytostatic interval therapy.
In Vorbereitung (1980)
24. HAMPEL, K. E.:
Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen
des Menschen.
Int. Z. f. Klin. Pharmakologie, Therapie und Toxikologie
4 , 322-371 (1968)
25. KIHLMANN, B. A.:
Action of chemicals on dividing cells.
Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey 1966
26. JACOB, M. , RAMAN, R. , SHARMA, T.:
Cell cycle kinetics of PHA-stimulated muntjac
lymphocytes in vitro: Part I-BrdU harlequin assay
system & demonstration of rapid proliferation of
lymphocytes
Indian Journal of Exper. Biol. 17 , 328-331 (1979)

27.KILIAN,D.J. ,PICCIANO,D.:

Cytogenetic surveillance of industrial populations
Aus"Chemical mutagens"principles and methods for
their detection.

Hollaender,A.Vol 4,Plenum Press,New York,London (1976)

28.KORENBERG,J.R. ,FREEDLENDER, E.F.:

Giemsa technique for the detection of sister
chromatid exchanges.

Chromosoma(Berl.) 48 ,355-360 (1974)

29.LAMBERT,B. ,RINGBORG,U. ,HARPER,E. ,LINDBLAD,A.:

Sister chromatd exchange in lymphocyte cultures of
patients receiving chemotherapy for malignant
disorders.

Cancer Treatm.Rep.10 ,1413-1419 (1978)

30.LATT,S.A.:

Microfluorometric detection of deoxyribonucleic
acid replication in human metaphase chromosomes.

Proc.Natl.Acad.Sci.(Wash.)70 ,3395-3399 (1973)

31.LATT,S.A.:

Sister chromatid exchange,indices of human chromosome
damage and repair:detection by fluorescence and
induction by mitomycin C.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA ,72 ,4066-4070 (1975)

32.MOORHEAD,P.S. ,NOWELL,P.C. ,MELLMAN,W.J. ,BATTIPS,D.M.
HUNGERFORD,D.A.:

Chromosome preparations of leukocytes cultured from
human peripheral blood.

Exp.Cell Res. 20 ,613-616 (1960)

33. MÜLLER, D. , ARNI, P. , FRITZ, H. , LANGAUER, M. , STRASSER, F.:
Comparative studies of 14 mutagenic or carcinogenic substances in seven mutagenicity test systems (point mutation tests, cytogenetic tests and the dominant lethal test).
Mut. Res. 53, 235 (1978)
34. MUTCHINICK, O. , RUZ, L. , CASAS, L.:
Time of first generation metaphases
I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures.
Mut. Res. 72, 127-134 (1980)
35. NIELSEN, J. , FRIEDRICH, U. , TSUBOI, T.:
Chromosome abnormalities in patients treated with chlorpromazine, perphenazine and lysergide.
Brit. Med. J. 3, 634-636 (1969)
36. OBE, G. , NATARAJAN, A. T.:
Umweltbedingte Mutationen beim Menschen
Kliniker 9, 271-289 (1980)
37. RIEGER, R. , MICHAELIS, A.:
Chromosomenmutationen
Fischer-Verlag, Jena 1967
38. SCHINZEL, A. , SCHMID, W.:
Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy.
Mut. Res. 40, 139-166 (1976)

- 39.SCHNEIDER,L. ,TICE,R.R. ,KRAM,D.:
Bromodeoxyuridine differential chromatid staining
technique:a new approach to examining sister
chromatid exchange and cell replikation kinetics.
Methods in cell biology(New York) 20,379-409 (1978)
- 40.SCHWARZACHER,H.G. ,WOLF,U.:
Methoden in der medizinischen Cytogenetik
Springer-Verlag,Berlin,Heidelberg,New York (1970)
- 41.TATES,A.D. ,NATARAJAN,A.T.:
A correlative study on the genetic damage induced by
chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia
of mice.I.CNU-Ethanol
Mut.Res.37 ,267-278 (1976)
- 42.TATES,A.D. ,NATARAJAN,A.T. ,DE VOGEL,N. ,MEIJERS,M.:
A correlative study on the genetic damage induced by
chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia
of mice.III BCNU
Mut.Res. 44,87-95 (1977)
- 43.TAYLOR,J.H. ,WOODS,P.S. ,HUGHES,W.L.:
The organisation and duplication of chromosomes as
revealed by autoradiographic studies using tritium,
labeled thymidine.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 43,122-127 (1957)
- 44.TAYLOR,J.H. ,HAUT,W.F. ,TUNG,J.:
Effects of fluorodeoxyuridine on DNA replikation,
chromosome breakage and reunion
Proc.Natl.Acad.Sci.(Wash.) 48,190-198 (1962)

45. TICE, R. , SCHNEIDER, E. L. , RARY, J. M.:

The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics.
Exp. Cell. Res. 102 , 232-236 (1976)

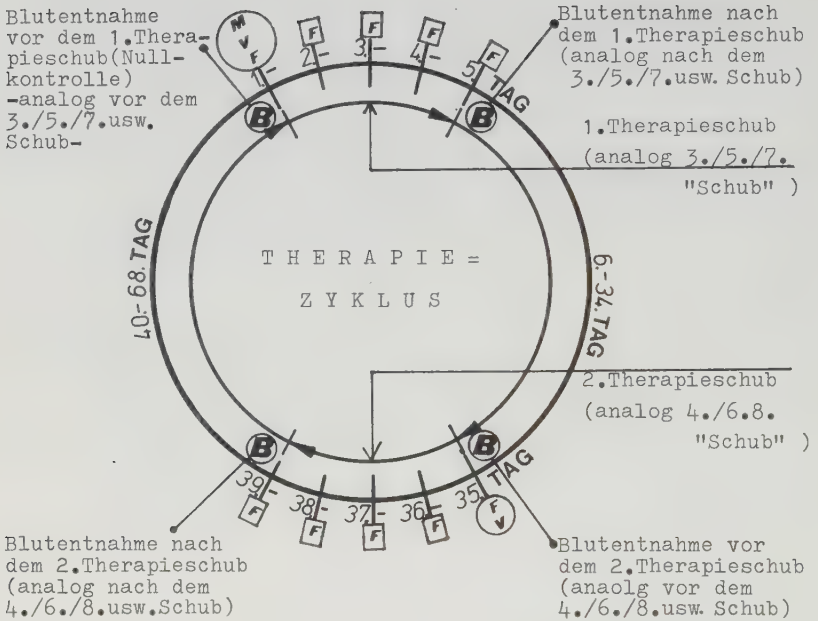
46. WHORTON, E. B. , BEE, D. E. , KILIAN, J.:

Variations in the proportion of abnormal cells and required sample sizes for human cytogenetic studies.
Mut. Res. 64, 79-86 (1979)

47. WOLFF, S. , PERRY, P.:

Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography.
Chromosoma (Berl.) 48 , 341-353 (1974)

7. ANHANG



F	= 5-Fluoruracil, ein Nukleinsäureantimetabolit, dessen zytostatische Wirkung über das metabolisch entstehende 5-Fluordesoxyuridin zustande kommt. Dosis: 300 mg/m^2 Körperoberfläche, intravenös.
M	= Methyl-CCNU, 1-[2-chloroethyl-3-(4-methylcyclohexyl)]-1-nitrosourea, ein Nitrosoharnstoffderivat aus der Gruppe der alkylierenden Substanzen. Dosis: 150 mg/m^2 Körperoberfläche, oral
V	= Vincristin, ein aus Vinca roses isoliertes Alkaloid, das über die Zerstörung des Spindelapparates die Teilung der Zelle verhindert. Dosis: 1 mg/m^2 Körperoberfläche, intravenös.

Abb. 1:

Therapieschema der durchgeführten Zytostase

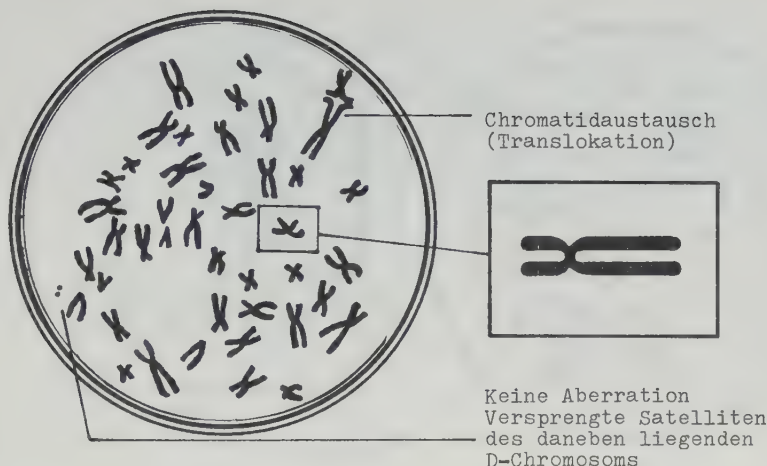


Abb.2:

Charakteristisches Färbemuster einer ersten Mitose
(alle Chromosomen sind gleichförmig dunkel gefärbt),
mit schematischer Darstellung einiger Aberrationen.

Der von WOLFF und PERRY (1974) beschriebenen Brom-Desoxy-uridin-Giemsa-Färbung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß die meisten Kernfarbstoffe (z.B. Giemsa) in ihrer Färbefähigkeit abgeschwächt werden, wenn in beiden Strängen der DNA-Doppelhelix anstelle der natürlich vorkommenden Base Thymin das chemische Analogon Bromdesoxyuridin eingebaut ist.

Wenn somit eine Zelle, die bis dahin in allen DNA-Strängen Thymin enthält ihren Chromosomensatz repliziert und dabei in die neu gebildeten Tochterstränge erstmals Bromdesoxyuridin anstelle von Thymin einbaut, so besteht anschließend jede Chromatide aus einem Mutterstrang der nach wie vor Thymin enthält und einem Tochterstrang mit Bromdesoxyuridin.

Bei der Anfärbung mit Giemsa kommt es zu keiner Beeinträchtigung. Alle Chromosomen färben sich gleichförmig dunkel an.

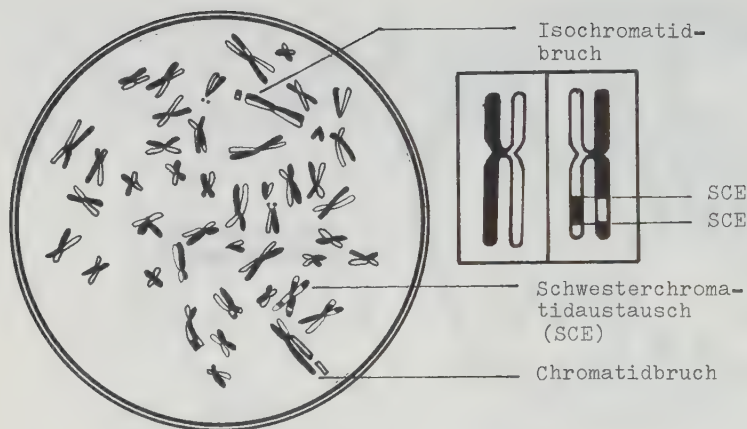


Abb.3:

Charakteristisches Färbemuster einer zweiten Mitose
(Jedes Chromosom enthält eine dunkle und eine hell
gefärbte Chromatide), mit schematischer Darstellung
einiger Aberrationen

Tritt die o.a.erste Mitose in eine weitere Zellteilung ein,
so dienen nunmehr pro Chromatide zwei formal verschiedene
DNA-Mutterstränge als Matrize für die neu zu bildenden
Tochterstränge:

Der eine DNA-Strang enthält nach wie vor Thymidin, der andere
DNA-Mutterstrang hat bereits Bromdesoxyuridin in der ersten
Replikation eingebaut. Die neu synthetisierten Tochterstränge
enthalten beide Bromdesoxyuridin. Die Folge ist, daß genau
die Hälfte aller Chromatiden einen DNA-Strang enthalten,
bei dem das ursprüngliche Thymidin immer noch enthalten
ist, während die andere Hälfte der Chromatiden in beiden
DNA-Strängen Bromdesoxyuridin enthält, was zum Verlust der
Anfärbbarkeit führt. Diese Chromatiden erscheinen im mikros-
kopischen Bild hell.

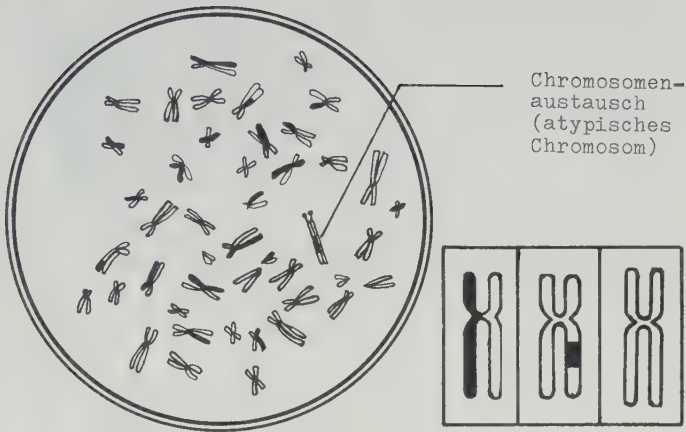


Abb.4:

Charakteristisches Färbemuster einer dritten Mitose (75% aller Chromatiden sind hell gefärbt), mit schematischer Darstellung einiger Aberrationen.

Bei jeder weiteren Zellteilung nehmen die Thymidin enthaltenden Chromatiden um den Faktor 0,5 ab. Eine 3. Mitose ist gekennzeichnet durch 75% helle Chromatiden, die der Metaphase im mikroskopischen Bild ein unverwechselbares Aussehen geben.

Gelegentlich kann man vereinzelt auch 4. Mitosen beobachten, bei denen die hellen Chromatiden so dominieren, daß sie fast völlig das Bild beherrschen. Dunkle Chromatiden oder Chromatidteile als Folge vorausgegangener Schwesterchromatidaustausche sind in 4. Mitosen nur sehr vereinzelt zu sehen.

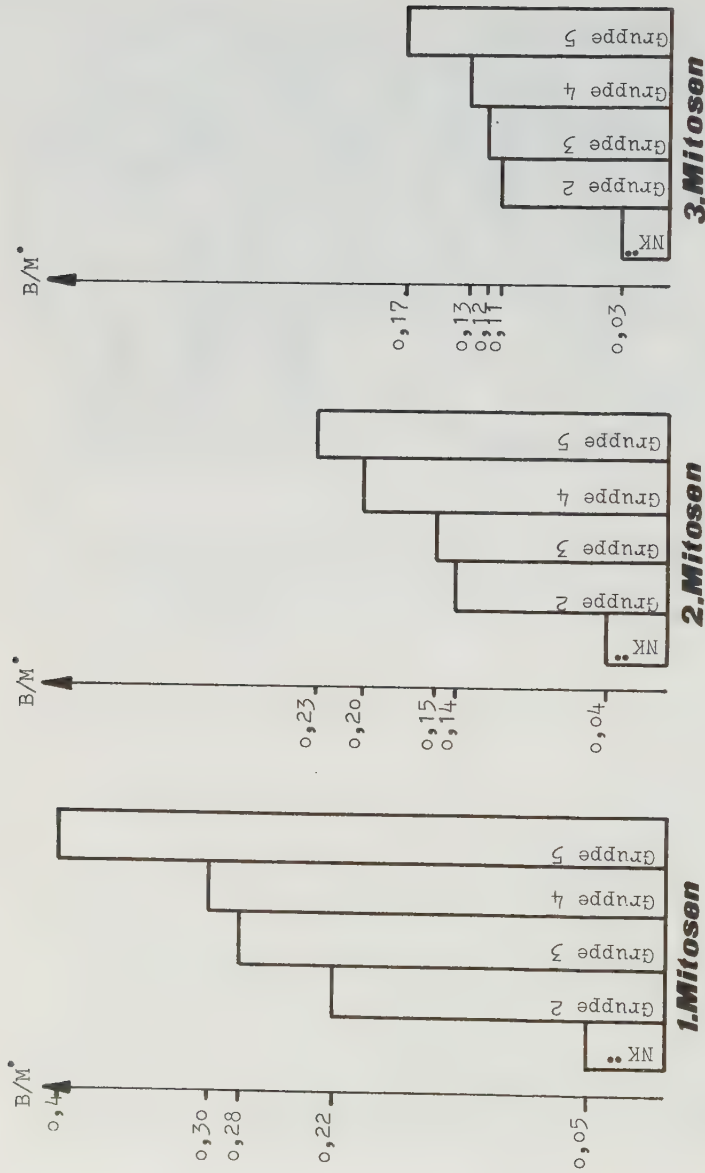


Abb. 5:

Verteilung der Bruchraten in 1./2. und 3. Mitosen im Verlauf der Therapie

• = Bruchrate

•• = Nullkontrolle/Gruppe 1

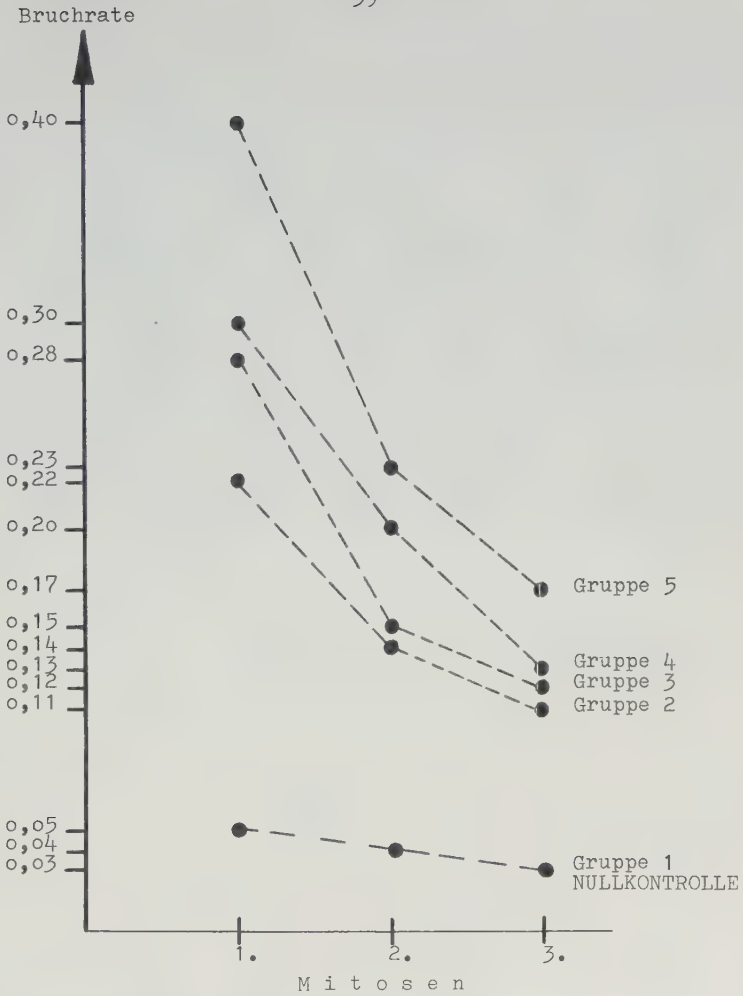


Abb.6:

Verteilung der Bruchraten in 1./2. und 3. Mitosen innerhalb der einzelnen Gruppen.

% aller gefundenen Aberrationen

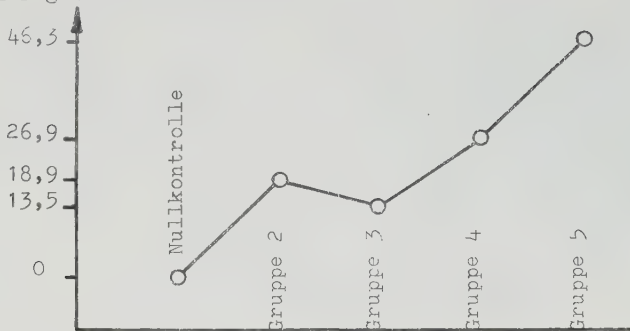


Abb.7:

Chromatidaustausche (Translokationen) in ersten Mitosen, dargestellt als Prozentzahl aller gefundenen Aberrationen in ersten Mitosen.

x-fache des Nullwertes

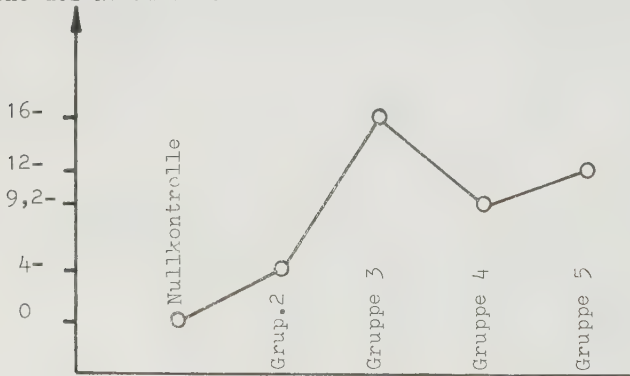


Abb.8:

Steigerung der "Isochromatidbrüche" in zweiten Mitosen unter der Therapie, dargestellt als Vielfaches des Nullkontrollenwertes

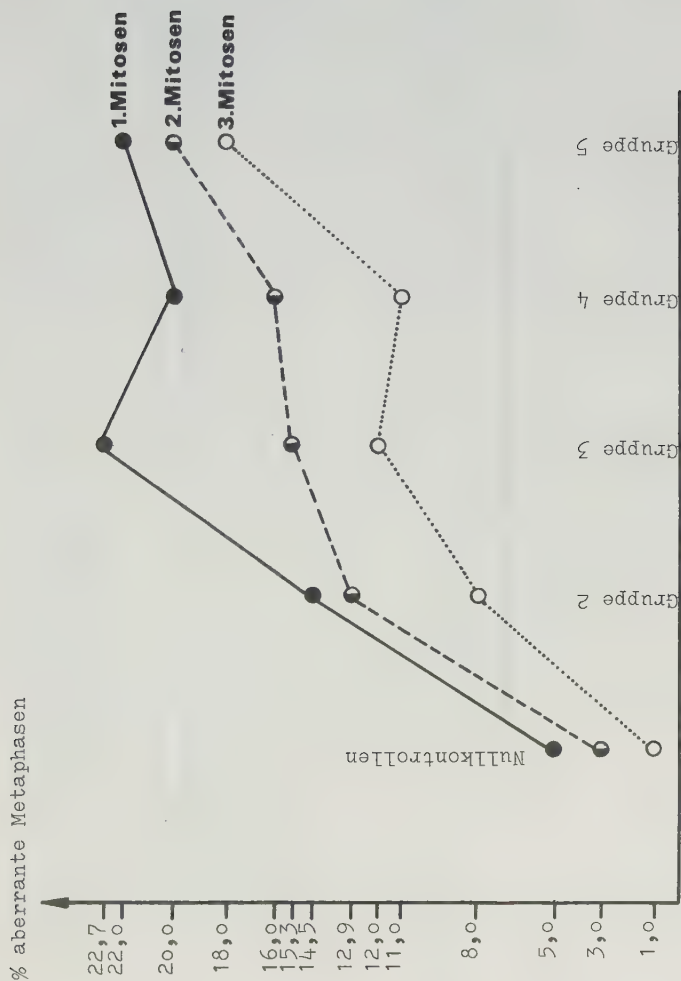


Abb. 9:

Verteilung der aberranten Metaphasen in 1./2. und 3. Mitosen mit zunehmender mutagener Belastung.

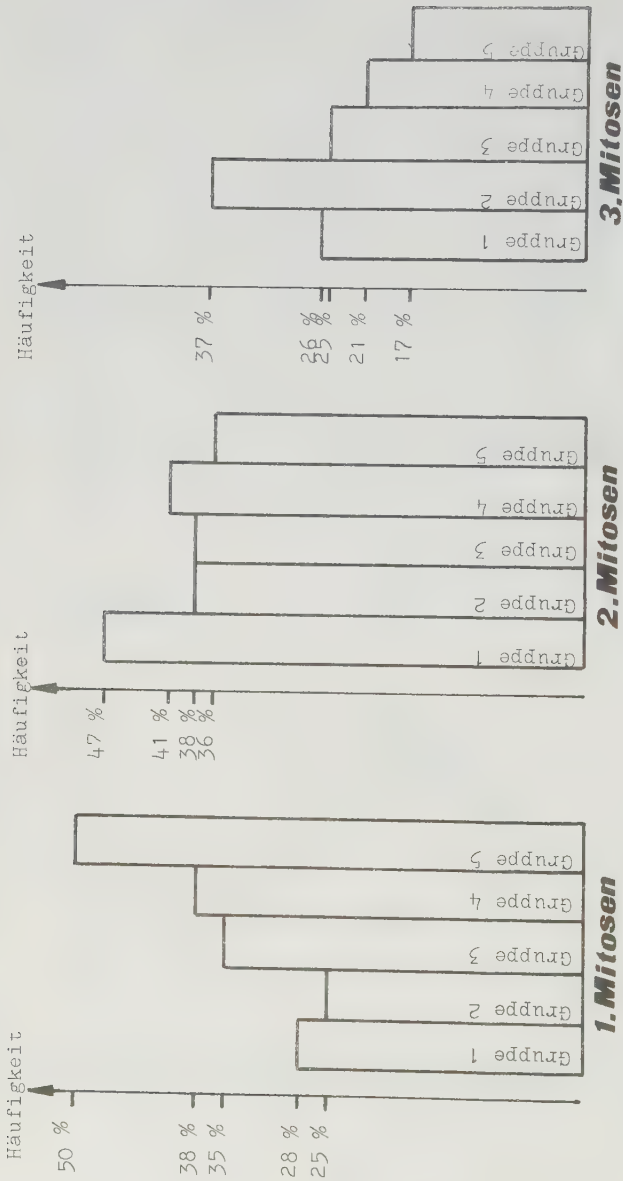


Abb. 10:

Häufigkeitsverteilung 1./2. und 3. Mitosen zu verschiedenen Zeiten der Zytostase

Übereinstimmung der
Bruchrate aus 100 "undifferenzierten" Mitosen
im Verhältnis zur
Bruchrate ermittelt aus 1. Mitosen

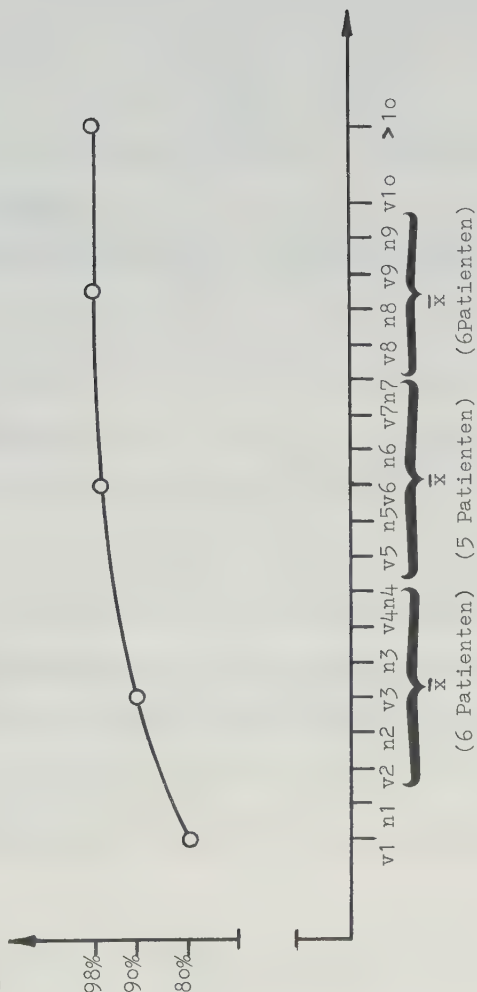


Abb. 11:

Verhalten der Bruchraten aus 100 "undifferenzierten" Mitosen (siehe Text) im Vergleich mit der Bruchrate, welche aus 50 ersten Mitosen ermittelt wurde, in Abhängigkeit von der Therapie.

Abk.: v= Blutentnahme vor-, n=Blutentnahme nach dem n. Therapieschub
 $\bar{x}$ = Mittelwert

	Gruppe 1: NULLKONTROLLE	Gruppe 2:	Gruppe 3:	Gruppe 4:	Gruppe 5:
--	----------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------

1.Mitosen

Bruchraten	0,05	0,22	0,28	0,30	0,40
Standardabweichung	0,01	0,12	0,09	0,16	0,15
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	4,4 - fache	5,6 - fache	6 - fache	8 - fache

2.Mitosen

Bruchraten	0,04	0,14	0,15	0,20	0,23
Standardabweichung	0,00	0,05	0,05	0,08	0,07
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	3,5 - fache	3,8 - fache	5 - fache	5,6 - fache

3.Mitosen

Bruchraten	0,03	0,11	0,12	0,13	0,17
Standardabweichung	0,01	0,03	0,00	0,08	0,05
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	3,7 - fache	4 - fache	4,3 - fache	5,7 - fache

Tabelle 1:

Bruchraten in 1./2. und 3. Mitosen in den verschiedenen Gruppen, mit der jeweiligen Standardabweichung und der Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle

	Gruppe 1 NULLKONTROLLE	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
--	---------------------------	----------	----------	----------	----------

1.Mitosen

Aberrante Mitosen	5 %	14,5 %	22,7 %	20 %	22 %
Standardabweichung	0,49	1,46	1,18	3,16	2,43
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	2,9 - fache	4,5 - fache	4 - fache	4,4 - fache

2.Mitosen

Aberrante Mitosen	3 %	12,9 %	15,3 %	16 %	20 %
Standardabweichung	0,49	1,72	2,36	3,95	2,43
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	4,3 - fache	5,1 - fache	5,3 - fache	6,7 - fache

3.Mitosen

Aberrante Mitosen	7 %	8 %	12 %	11 %	18 %
Standardabweichung	0,59	1,29	0,00	2,58	3,55
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	8 - fache	12 - fache	11 - fache	18 - fache

Tabelle 2:

Prozentualer Anteil aberranter Metaphasen in jeweils 50 ausgewerteten 1./2. und 3. Mitosen unabhängig von der Proliferationskinetik, mit Standardabweichung und Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle

1.Mitosen

	Gruppe 1 NULLKONTROLLE	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
--	---------------------------	----------	----------	----------	----------

Chromatidbrüche	1	4,5	5,3	4,2	3,8
Standardabweichung	0,49	1,94	1,77	1,80	1,94
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	4,5 - fache	5,3 - fache	4,2 - fache	3,8 - fache

Isochromatidbrüche	1,5	3	5,3	5	3,5
Standardabweichung	0,49	1,94	1,77	2,40	2,92
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	2 - fache	3,5 - fache	3,3 - fache	2,3 - fache

Chromatidaustausche	0	1,8	1,7	3,4	6,3
Standardabweichung	—	1,94	2,96	1,80	1,94
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um	—	1,8	1,7	3,4	6,3

Tabelle 3:

Spektrum der gefundenen Aberrationen in 1.Mitosen,bezogen auf jeweils 50 Metaphasefiguren,mit der zugehörigen Standardabweichung und der Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle.

2.Mitosen

	Gruppe 1 NULLKONTROLLE	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
--	---------------------------	----------	----------	----------	----------

Chromatidbrüche	1,5	5,4	3,7	5,9	7,8
Standardabweichung	0,92	3,01	0,59	2,7	2,43
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	3,6 - fache	2,5 - fache	3,9 - fache	5,2 - fache

Isochromatidbrüche	0,25	1	4	2,3	3
Standardabweichung	0,49	0,43	1,77	1,20	0,97
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	4 - fache	16 - fache	9,2 - fache	12 - fache

Austausche	0	0,2	0	0,2	0,25
Standardabweichung	—	0,43	—	0,30	0,49
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um	—	0,2	—	0,2	0,25

Tabelle 4:

Spektrum der gefundenen Aberrationen in 2.Mitosen,bezogen auf jeweils 50 Metaphasefiguren,mit der zugehörigen Standardabweichung und der Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle.

3. Mitosen

	Gruppe 1 NULLKONTROLLE	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
--	---------------------------	----------	----------	----------	----------

Chromatidbrüche	0,25	4,4	3,3	4,3	6,7
Standardabweichung	0,49	1,29	1,18	3,56	2,96
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	17,5 - fache	13,2 - fache	17,2 - fache	26,8 - fache

Isochromatidbrüche	0,25	4	2,7	1,3	2
Standardabweichung	0,49	0,43	1,77	0,79	1,18
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um das	—	16 - fache	10,8 - fache	5,2 - fache	8 - fache

Austausche	0	0,4	0	0	0
Standardabweichung	—	0,43	—	—	—
Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle um	—	0,4	—	—	—

Tabelle 5:

Spektrum der gefundenen Aberrationen in 3. Mitosen, bezogen auf jeweils 50 Metaphasefiguren, mit den zugehörigen Standardabweichungen und der Steigerung im Vergleich zur Nullkontrolle.

Therapiestand		Verhältnis(=Steigerung) der Bruchraten bei den ($E_2:E_1$) tatsächlich gefundenen Einzelergebnissen und ($M_2:M_1$) den Mittelwerten der jeweiligen Gruppen.					
		$E_2:E_1$	$M_2:M_1$	$E_2:E_1$	$M_2:M_1$	$E_2:E_1$	$M_2:M_1$
1	v 8 =Gruppe 4	1,4	1,0	1,1	1,0	---	---
	v 11 =Gruppe 4						
2	v 2 =Gruppe 2	1,8	1,3	1,8	1,4	1,8	1,2
	v 9 =Gruppe 4						
3	v 1 =Gruppe 1	5,0	8,0	6,0	5,6	---	---
	n 10 =Gruppe 5						
4	v 1 =Gruppe 1	5,5	5,6	3,5	3,8	6,0	4,0
	n 5 =Gruppe 3						
		1.Mitosen		2.Mitosen		3.Mitosen	

Tabelle 6:

Direkte Verlaufskontrolle der Bruchraten in 1./2. und 3. Mitosen bei vier Patienten unter zunehmender mutagener Belastung.

	Gruppe 1 Nullkontrolle	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
--	---------------------------	----------	----------	----------	----------

1. Mitosen

Häufigkeit	28%	25%	35%	38%	50%
Standardabweichung	3,58	14,1	17,1	18,2	16,0

2. Mitosen

Häufigkeit	47%	38%	38%	41%	36%
Standardabweichung	8,06	1,8	3,6	9,5	8,3

3. Mitosen

Häufigkeit	26%	37%	25%	21%	17%
Standardabweichung	4,48	16,0	10,6	21,3	10,2

Tab.7:

Häufigkeitsverteilung 1./2. und 3. Mitosen unter der Therapie

8.DOKUMENTATION

Codenummer	Geschlecht	Alter bei Blutentnahme	Therapiestand*	Gruppe	ausgewertete Mitosen	Chromatidbrüche	Isochromatidbrüche	Chromatid-austausche	Chromosomen-austausche	Bruchraten	aberrante Mitosen
Z 66	w	41 J	n2	3	50	7	5	0	0	0.24	12
Z 67	m	65 J	n6	5	50	5	6	9	0	0.58	14
Z 84	m	34 J	n9	5	50	4	0	9	0	0.44	10
Z 123	w	43 J	v1	1	50	0	2	0	0	0.04	2
Z 133	m	27 J	n4	3	50	5	4	5	0	0.38	12
Z 134	w	41 J	n5	3	50	4	7	0	0	0.22	10
Z 144	w	54 J	v2	2	50	2	3	2	0	0.18	6
Z 301	w	54 J	v9	4	45	5	4	3	0	0.33	13
Z 303	w	67 J	v3	2	50	6	3	0	0	0.18	8
Z 310	w	54 J	v1	1	50	0	2	0	0	0.04	2
Z 327	m	36 J	v8	4	50	3	5	1	0	0.20	9
Z 339	w	58 J	v1	1	50	2	1	0	0	0.06	3
Z 341	m	58 J	v18	4	50	2	9	9	0	0.58	13
Z 344	w	43 J	n10	5	50	1	4	5	0	0.30	9
Z 367	m	52 J	v8	4	50	6	8	1	0	0.32	10
Z 374	w	61 J	v10	4	50	4	2	2	0	0.20	6
Z 382	w	42 J	v3	2	17	nicht auswertbar					
Z 392	m	70 J	v8	4	50	2	8	4	0	0.36	13
Z 404	w	24 J	v1	1	50	1	1	0	0	0.04	2
Z 411	w	42 J	n6	5	50	5	4	2	0	0.26	10
Z 417	m	60 J	v4	2	50	4	1	1	0	0.14	6
Z 426	m	36 J	v11	4	50	2	4	4	0	0.28	9
Z 431	w	56 J	v5	2	50	6	5	4	0	0.38	9
Z 432	w	67 J	v7	4	50	0	5	1	0	0.14	5
Z 448	w	56 J	v9	4	50	6	1	6	0	0.38	10

Liste 1: Einzelergebnisse bei ersten Mitosen

Abk: n= nach-, V = vor dem n. Therapieschub

Codenummer	Geschlecht	Alter bei Blutentnahme	Therapiestand*	Gruppe	ausgewertete Mitosen	Chromatidbrüche	Isochromatidbrüche	Chromatid-austausche	Chromosomen-austausche	Bruchraten	aberrante Mitosen
Z 66	w	41 J	n2	3	50	3	3	0	0	0.12	6
Z 67	m	65 J	n6	5	50	10	4	1	0	0.32	13
Z 84	m	34 J	n9	5	50	8	3	0	0	0.22	10
Z 123	w	43 J	v1	1	50	2	0	0	0	0.04	2
Z 133	m	27 J	n4	3	50	4	6	0	0	0.20	10
Z 134	w	41 J	n5	3	50	4	3	0	0	0.14	7
Z 144	w	54 J	v2	2	50	3	2	0	0	0.10	5
Z 301	w	54 J	v9	4	45	5	3	0	0	0.18	8
Z 303	w	67 J	v3	2	50	5	0	0	1	0.14	6
Z 310	w	54 J	v1	1	50	2	0	0	0	0.04	2
Z 327	m	36 J	v8	4	50	7	1	0	0	0.16	8
Z 339	w	58 J	v1	1	50	2	0	0	0	0.04	1
Z 341	m	58 J	v18	4	50	11	2	0	1	0.30	14
Z 344	w	43 J	n10	5	50	8	2	0	0	0.20	8
Z 367	m	52 J	v8	4	50	4	3	1	0	0.18	6
Z 374	w	61 J	v10	4	50	4	1	0	0	0.10	4
Z 382	w	42 J	v3	2	50	5	1	0	0	0.12	6
Z 392	m	70 J	v8	4	50	5	5	0	0	0.20	10
Z 404	w	24 J	v1	1	50	0	1	0	0	0.02	1
Z 411	w	42 J	n6	5	50	5	3	0	0	0.16	8
Z 417	m	60 J	v4	2	50	4	1	0	0	0.10	5
Z 426	m	36 J	v11	4	50	6	2	0	0	0.16	7
Z 431	w	56 J	v5	2	50	10	1	0	0	0.22	9
Z 432	w	67 J	v7	4	50	2	2	0	0	0.08	4
Z 448	w	56 J	v9	4	50	9	2	0	0	0.30	12

Liste 2: Einzelergebnisse bei zweiten Mitosen

Codenummer	Geschlecht	Alter bei Blutentnahme	Therapiestand*	Gruppe	ausgewertete Mitosen	Chromatidbrüche	Isochromatidbrüche	Chromatid-austausche	Chromosomen-austausche	Bruchraten	aberrante Mitosen
Z 66	w	41 J	n2	3	50	5	1	0	0	0.12	6
Z 67	m	65 J	n6	5	50	6	3	0	0	0.18	12
Z 84	m	34 J	n9	5	50	9	1	0	0	0.20	9
Z 123	w	43 J	v†	1	50	0	1	0	0	0.02	1
Z 133	m	27 J	n4	3	50	2	4	0	0	0.12	6
Z 134	w	41 J	n5	3	50	3	3	0	0	0.12	6
Z 144	w	54 J	v2	2	50	4	1	0	0	0.10	4
Z 301	w	54 J	v9	4	28	nicht auswertbar					
Z 303	w	67 J	v3	2	50	3	0	1	0	0.10	4
Z 310	w	54 J	v1	1	50	1	0	0	0	0.02	1
Z 327	m	36 J	v8	4		nicht auswertbar					
Z 339	w	58 J	v1	1	35	nicht auswertbar					
Z 341	m	58 J	v18	4		nicht auswertbar					
Z 344	w	43 J	n10	5		nicht auswertbar					
Z 367	m	52 J	v8	4	50	3	3	0	0	0.12	6
Z 374	w	61 J	v10	4	50	5	0	0	0	0.10	5
Z 382	w	42 J	v3	2	50	5	0	0	0	0.10	5
Z 392	m	70 J	v8	4		nicht auswertbar					
Z 404	w	24 J	v1	1	50	0	0	0	0	0.00	0
Z 411	w	42 J	n6	5	50	4	2	0	0	0.12	6
Z 417	m	60 J	v4	2	50	4	0	0	0	0.08	4
Z 426	m	36 J	v11	4	50	3	1	0	0	0.08	4
Z 431	w	56 J	v5	2	50	6	1	1	0	0.18	7
Z 432	w	67 J	v7	4	50	1	2	0	0	0.06	3
Z 448	w	56 J	v9	4	50	10	1	0	0	0.22	9

Liste 3: Einzelergebnisse bei dritten Mitosen

Codenummer	Geschlecht	Alter bei Blutentnahme	Therapiestand *	Gruppe	% 1.Mitosen	% 2.Mitosen	% 3.Mitosen	Bruchrate ge- bildet aus 100 "undifferenzierten" Mitosen	Bruchrate ge- bildet aus 50 ersten Mitosen
Z 66	w	41 J	n2	3	20	40	34	0.18	0.24
Z 67	m	65 J	n6	5	57	31	12	0.46	0.58
Z 84	m	34 J	n9	5	62	25	13	0.36	0.44
Z 133	m	27 J	n4	3	35	39	26	0.32	0.38
Z 134	w	41 J	n5	3	50	34	16	0.18	0.22
Z 144	w	54 J	v2	2	30	39	31	0.16	0.18
Z 301	w	54 J	v9	4	24	44	32	0.26	0.33
Z 310	w	54 J	v1	1	26	51	23	0.04	0.04
Z 327	m	36 J	v8	4	45	52	3	0.18	0.20
Z 339	w	58 J	v1	1	30	42	28	0.05	0.06
Z 341	m	58 J	v18	4	61	36	3	0.57	0.58
Z 344	w	43 J	n10	5	52	42	6	0.28	0.30
Z 367	m	52 J	v8	4	29	46	25	0.30	0.32
Z 382	w	42 J	v3	2	10	37	53	0.15	
Z 392	m	70 J	v8	4	55	37	8	0.28	0.36
Z 411	w	42 J	n6	5	28	45	27	0.20	0.26
Z 417	m	60 J	v4	2	34	40	26	0.12	0.14
Z 448	w	56 J	v9	4	15	28	57	0.32	0.38

Liste 4: Einzelergebnisse über die Proliferationskinetik und die Unterschiede bei den Bruchraten erster Mitosen und den Bruchraten in undifferenzierten Präparaten.

*Abk. : v= vor-, n=nach dem n. Therapieschub.
z.B. v9 bedeutet, daß die Blutentnahme vor dem neunten Therapieschub erfolgte, also 28 Tage nach der letzten Zytostatikaapplikation.

	Codenummer	Geschlecht	Alter bei Blutentnahme	Therapiestand	Gruppe		ausgewertete Mitosen	Chromatidbrüche	Isochromatidbrüche	Chromatidaus- tausche	Chromosomen- austausche	Bruchrate	aberrante Metaphasen
Patient 1:	Z 327	m	36 J	v8	4	1. Mitosen	50	3	5	1	0	0.20	9
						2. Mitosen	50	7	1	0	0	0.16	8
						3. Mitosen	nicht auswertbar						
	Z426			v11	4	1. Mitosen	50	2	4	4	0	0.28	9
						2. Mitosen	50	6	2	0	0	0.16	7
Patient 2:						3. Mitosen	50	3	1	0	0	0.08	4
	Z 144	w	54 J	v2	2	1. Mitosen	50	2	3	2	0	0.18	6
						2. Mitosen	50	3	2	0	0	0.10	5
						3. Mitosen	50	4	1	0	0	0.10	4
	Z 301			v9	4	1. Mitosen	45	5	4	3	0	0.33	13
						2. Mitosen	45	5	3	0	0	0.18	8
						3. Mitosen	nicht auswertbar						

Liste 5:
Verlaufsbeobachtung unter der Therapie bei vier Patienten

	Codenummer	Geschlecht	Alter bei Blutabnahme	Therapie-stand°	Gruppe		ausgewertete Mitosen	Chromatidbrüche	Isoschromatidbrüche	Chromatid- austausche	Chromosomen- austausche	Bruchrate	aberrante Metaphasen
Patient 3:	Z 123	w	43 J	v1	1	1. Mitosen	50	0	2	0	0	0.04	2
						2. Mitosen	50	2	0	0	0	0.04	2
						3. Mitosen	50	0	1	0	0	0.02	1
	Z 344			n10	5	1. Mitosen	50	1	4	5	0	0.30	9
						2. Mitosen	50	8	2	0	0	0.20	8
							3. Mitosen	nicht auswertbar					
Patient 4:	Z 66	w	41 J	v1	1	1. Mitosen	50	0	2	0	0	0.04	2
						2. Mitosen	50	2	0	0	0	0.04	2
						3. Mitosen	50	1	0	0	0	0.02	1
	Z 134			n5	3	1. Mitosen	50	4	7	0	0	0.22	10
						2. Mitosen	50	4	3	0	0	0.14	7
						3. Mitosen	50	3	3	0	0	0.12	6

Liste 6:

Verlaufsbeobachtung unter der Therapie bei vier Patienten-Fortsetzung

°Abk: v= vor-, n=nach dem n. Therapieschub

Herrn Professor Dr.med.R.A.Pfeiffer danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Institut für Humangenetik und Anthropologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.E.Gebhart für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvolle und geduldige Unterstützung, die er mir bei der Durchführung dieser Arbeit gewährte.

Herzlich bedanken möchte ich mich weiterhin bei den Mitarbeiterinnen in der Dependance des Institutes, die mir stets freundlich und hilfreich zur Seite standen.

Lebenslauf:

Am 20. September 1950 wurde ich, Robert Lee Müller in Nürnberg geboren, wo ich auch zur Schule ging und im März 1974 am Nürnberg-Kolleg das Abitur erwarb.

Zum Sommersemester des gleichen Jahres immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen im Studienfach Physik.

Seit dem Wintersemester 1974/75 betrieb ich an derselben Universität das Studium der Humanmedizin, unterbrochen durch die Ableistung meiner Dienstzeit beim Bayerischen Roten Kreuz.

Am 5.11.1981 konnte ich durch Bestehen der Ärztlichen Prüfung in Erlangen mein Studium erfolgreich beenden. Die Approbation als Arzt wurde mir am 10. November 1981 durch das Bayerische Staatsministerium des Innern erteilt.

